



関西学院大学リポジトリ

Kwansei Gakuin University Repository

酢酸菌における低pH応答性転写因子の機能解析

著者	石井 友理
URL	http://hdl.handle.net/10236/00028242

酢酸菌における低 pH 応答性転写因子の機能解析

関西学院大学大学院理工学研究科

生命科学専攻 藤原研究室 石井 友理

酢酸菌は、古くから食酢醸造に用いられてきた微生物である。酢酸菌の中でも *Komagataeibacter europaeus* は、高いエタノール酸化能力および酢酸耐性を有し、食酢製造の現場で利用されている。酢酸菌によるエタノール酸化および酢酸の産生に伴い、外環境の pH は低下するが、酢酸菌は種々の酢酸耐性機構を有している。本研究では、バクテリアおよびアーキアにおいて広く保存されている転写因子 Lrp(Leucine responsive regulatory protein)の酢酸菌 *K. europaeus* におけるオルソログ(*KeLrp*)に注目し、この転写因子が細胞内の pH センサーとして機能し、多くの遺伝子発現に影響を及ぼしていることを示した。

著者は本論文において、酢酸酸性下での *K. europaeus* 生存における *KeLrp* の機能解明を主たる目的とし、*KeLrp* の新規標的遺伝子の同定、さまざまな pH 条件下における *KeLrp* の標的遺伝子に対する結合親和性の解析、トランスクリプトーム解析による *Kelrp* 破壊株の遺伝子発現動態解析、および得られたデータをもとに *KeLrp* による遺伝子発現制御機構を推定した。

まず、*Kelrp* 完全欠損株が示すアミノ酸要求性を指標として、*KeLrp* により制御されるアミノ酸代謝経路および遺伝子を特定した。また、*Kelrp C* 末端側部分欠損株における標的遺伝子の発現動態をもとに、*Kelrp* 部分欠損株培養液に蓄積する代謝産物として、ポリアミンを新規に特定した。

食酢主成分である酢酸はショウジョウバエ誘引物質として機能することから、食酢は捕虫器原料としても用いられている。*Kelrp* 部分欠損株の培養液中には酢酸と同様にショウジョウバエ誘引性を示す代謝産物、アセトインを高蓄積しており、野生株の培養液と比較して迅速にキイロショウジョウバエを捕捉する。*KeLrp* 標的遺伝子の特定実験から、*Kelrp* 部分欠損株培養液に蓄積する代謝産物としてポリアミンが見出された。これを受け、ポリアミンのショウジョウバエに対する誘引性を精査した。欧米の果樹栽培において甚大な被害を引き起こして

いるオウトウショウジョウバエを解析対象として供試した。はじめに種々のポリアミン水溶液を用いた捕虫実験を行い、それらの誘引性を評価した。続いて、使用する酢酸菌および製造手法の違いによって、食酢に最終的に含まれるポリアミン含量に差異が生じることを明らかにした。さらに、ポリアミン含量の異なる食酢を用いた捕虫実験を行い、オウトウショウジョウバエの高効率な捕捉を達成する上での、食酢に含まれるポリアミンの重要性を明らかにした。

細胞内 pH が一定に保たれる一般的な微生物とは異なり、酢酸菌の細胞内 pH はエタノール酸化による酢酸の産生に伴い低下することが予測される。実際、pH 感受性改変型 green fluorescent protein、GFP 発現株を用いて、大腸菌および *K. europaeus* の細胞内 pH を推定したところ、*K. europaeus* の細胞内 pH が酢酸生成に伴い低下することが確認された。そこで、大腸菌由来 Lrp(*EcLrp*)および *KeLrp* の標的遺伝子プロモーターに対する結合親和性、およびそれらのタンパク質分子としての構造安定性を比較解析した。*EcLrp* および *KeLrp* 組換えタンパク質とそれぞれの標的遺伝子プロモーター領域を用いたゲルシフトアッセイをさまざまな pH 条件下で行い、*KeLrp* が低 pH 依存的に標的 DNA へ結合することを明らかにした。また、円偏光二色性分析を行い、*KeLrp* の二次構造が広範な pH 条件下で安定的に維持されることを明らかにした。

最後に、*K. europaeus* 野生株、*Kelrp* 完全欠損株、および *Kelrp* 部分欠損株の mRNA を供試し、トランスクリプトーム解析を行なった。本解析により、アミノ酸代謝以外の、*KeLrp* の新規標的遺伝子を探索した。また、*Kelrp* 完全欠損株および部分欠損株の遺伝子発現動態を比較することで、*KeLrp* における C 末端側領域の役割を考察した。

一連の解析から、*KeLrp* はアミノ酸の生合成に加え、ポリアミンの分泌や糖代謝などにも関与することを明らかにした。また、食酢中のポリアミンが飛翔昆虫誘引性を増強する上で効果的であることを示した。さらに *KeLrp* は低 pH 依存的に標的 DNA へ結合することを見出した。これらより、細胞内 pH がエタノール酸化に伴い低下する酢酸菌において、*KeLrp* は細胞内で pH センサーとして機能し、細胞内の種々の代謝を包括的に調節する中心的な転写因子である可能性が示唆された。